

5. Kietadisorn, R. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities / R. Kietadisorn, P. Juni Rio, An. L Moens // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 302. – P. E481-E495.
6. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model / N. Abu-Saleh [et al.] // *Life Sci.* – 2012. – Vol. 91, №13-14. – P. 669-675.
7. Descorbeth, M. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11 α proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells / M.Descorbeth, M.B. Anand-Srivastava // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol. 49, №9 – P.1395-1405.

УДК 616-052-002.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ IGG К РАСЩЕПЛЕНИЮ ПЕПТИДОГЛИКА НА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ БАКТЕРИЙ

Лептеева Т.Н., Сенькович С.А., Шилин В.Е.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Введение. Проблема хирургической инфекции в настоящее время остается одной из актуальных для здравоохранения Республики Беларусь. Увеличение числа осложнений операционных ран и гнойно-воспалительных заболеваний многочисленными авторами связывается с широким и нерациональным использованием антибиотиков, ростом устойчивости микроорганизмов к ним, снижением резистентности макроорганизма [1, 2]. Пациенты с гнойными заболеваниями составляют 35-40% среди всех госпитализированных в хирургические отделения, частота развития послеоперационных осложнений достигает в среднем 30-40%, а летальность среди них 70%, что значительно увеличивает экономические потери общества: продолжительное пребывание пациента в стационаре и дополнительные расходы по его лечению [3]. Интерес и постоянное внимание к этой проблеме объясняется тяжелым течением раневого процесса, сохранением тенденции к возрастанию количества длительно текущих и рецидивирующих процессов [4].

Цель работы. Определить способность IgG к расщеплению пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Материал и методы. Для выделения пептидогликана из грамположительных бактерий использовали *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, так как данная культура наиболее чувствительная к лизоциму. *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) выращивают на мясо-пептонном агаре. Суточную культуру дважды отмывали физиологическим раствором от компонентов питательной среды. Центрифугировали 1,7 тыс. об/мин в течение 40 мин. К полученной суспензии добавляли 20 мл предварительно нагретого до 90°C 30%-ного водного фенола. Смесь перемешивали в течение 20 минут при температуре 85-87°C, после чего охлаждали до температуры 20-23°C и трижды центрифугировали в течение 10 мин при 1,7 тыс. об/мин, каждый раз удаляя надосады. На данном этапе происходило освобождение от липополисахарида (ЛПС), белков, нуклеиновых кислот и других нековалентно связанных с пептидогликаном клеточной стенки компонентов бактериальной клетки. В качестве экстрагента использовали 30%-ный водный фенол при температуре от 65-68°C (экстракция по Вестфалу), так как при этой температуре происходит полная гомогенизация смеси фенола и воды. К полученному раствору добавляли дистиллированную воду до общего объема 300 мл и 3 мл 100% уксусной кислоты. Продукт, полученный на предыдущей стадии, перемешивали при температуре 100°C в течение 3 часов с целью освобождения от следовых количеств ЛПС. Осадок после охлаждения помещали на магнитную мешалку в течение 10 минут и

отделяли центрифугированием 20 минут при 2,0 тыс. об/мин, трижды промывая водой. Из полученного продукта выделяли надосадок. Далее проводили диализ при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$, периодически в течение 3-х суток удаляя диализат 1 раз в сутки и добавляя в сосуд свежий буферный раствор. Диализ проводили с целью удаления низкомолекулярных продуктов, которые образуются в процессе гидролиза. В качестве буферного раствора использовали 0,05 М буферный раствор ацетата натрия pH 5,8. Суспензию, полученную после диализа, делили на надосадок и осадок, последний разбивали ультразвуком в течение 60 мин, затем отмывали 1 раз физ. раствором. Полученную суспензию с целью очистки от ДНК обрабатывали ДНК-азой 1,7 мг на 1 мл, инкубировали в термостате 30 минут, отмывали физ. раствором до прозрачного надосадка 1 раз в режиме 10 000 оборотов (7930 g) в течение 7 минут.

Суспензию, полученную на предыдущем этапе, метили 2%-ым раствором Конго красного в соотношении 20 мкл на 1 мл суспензии, центрифугировали 2 раза в течение 1 часа при 1000 оборотов в минуту (200 g) для удаления не связавшегося красителя.

Качественные и количественные характеристики выделенного пептидогликана контролировали посредством конфокальной микроскопии. Готовили препарат виская капля и проводили послойное сканирование на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE в режиме XYZ - лазер 405нм, спектральная зона детекции 550-680 нм.

Реакционная смесь состояла из 0,4 мл суспензии пептидогликана, меченного конго-красным и 0,1 мл IgG в концентрации 1 мг/мл. В контрольных пробах вместо препарата IgG использовали 0,9% NaCl. После 24 часов инкубации при 37°C не разрушенные компоненты пептидогликана осаждали центрифугированием (7930 g) на центрифуге MIKRO 120 (Hettich) и измеряли оптическую плотность 0,1 мл надосадка на многоканальном спектрофотометре Ф-300 ТП при длине волны 492 нм. Результат выражали в единицах оптической плотности (Еоп) как разницу между оптической плотностью опытных и контрольных лунок.

Результаты и обсуждение. В связи с тем, что бактерицидная активность иммуноглобулинов G может быть связана с их способностью к расщеплению компонентов клеточной стенки бактерий, мы определили их способность к расщеплению пептидогликана. Обнаружено, что у доноров уровень способности иммуноглобулинов G расщеплять пептидогликан клеточной стенки бактерий достоверно выше, чем у лиц с гнойно-воспалительными процессами. Возможно, снижение способности иммуноглобулинов расщеплять пептидогликан является предрасполагающим фактором развития гнойно-воспалительных заболеваний.

Выводы. Не выявлено корреляции между бактерицидной активностью иммуноглобулинов и их способностью к расщеплению пептидогликана. Нельзя исключить, что это обусловлено отличиями в структуре пептидогликана *S. aureus* и *M. lysodeikticus*, но возможно, бактерицидные свойства иммуноглобулинов не связаны с их способностью разрушать клеточную стенку бактерий.

Литература:

1. Проблема внутрибольничных инфекций в Республике Беларусь: основные направления, перспективы борьбы и профилактики / Гудкова Е.И. [и др.] // Белорус. мед. журн. – 2005. – № 2. – С. 4-7.
2. Antibiotikoprofilaktika, antibiotikoterapiya i mikrobiologicheskayasituaciya v hirurgicheskom stacionare / V.N. Obolenskij [et al.] // Antibiotikii himioterapiya. – 2004. – Vol. 9, N 10. – P. 13–19.
3. Титов, Л.П. Контроль за внутрибольничными инфекциями, их этиологической структурой и резистентностью к антибиотикам / Л.П. Титов, Т.С. Ермакова, В.А. Горбунов // Здоровоохранение. – 2009. – № 10. – С. 63–66.
4. Светухин, А.М. Гнойная хирургия: современное состояние проблемы, - 50 лекций по хирургии / А.М. Светухин, Ю.А. Амирасланов. – М. : Медиа Медика, 2003. – С. 335-44.